

## • 实验研究 •

## 芍药苷促进骨折大鼠血管生成和骨折愈合的机制研究

沈润斌<sup>1</sup> 张倩<sup>1</sup> 王旭洋<sup>1</sup> 李国梁<sup>1</sup> 马世强<sup>1</sup> 苑翠翠<sup>1</sup> 靳涛<sup>1</sup> 韩广普<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探究芍药苷调节缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )/血管内皮生长因子(VEGF)信号通路对骨折大鼠血管生成和骨折愈合的影响。方法:构建胫骨骨折大鼠模型,将骨折模型大鼠随机分为模型组、低剂量芍药苷组、高剂量芍药苷组、联合干预组。其中低、高剂量芍药苷组分别腹腔注射 5, 20 mg/kg 芍药苷,联合干预组腹腔注射 20 mg/kg 芍药苷+100 mg/kg 的 PX-478(HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路抑制剂),持续给药 4 周,每组各 6 只。同批鼠中随机选取 6 只健康大鼠(只做右下肢切开伤口缝合不锯断胫骨)作为假手术组,假手术组和模型组注射等量的生理盐水。ELISA 法检测血清中的碱性磷酸酶(ALP)、钙、磷水平;X 射线检测胫骨骨折愈合程度;生物力学实验检测大鼠相关指标;苏木精-伊红(HE)检测骨折部位血管生成情况;Western Blot 法检测 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 蛋白。结果:与假手术组相比,模型组大鼠胫骨有明显的骨折线,较多成熟骨组织,骨小梁排列呈网状,血清中碱性磷酸酶、磷、钙水平、最大载荷、刚度、血管数量、血管面积及 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达均明显降低( $P < 0.05$ );与模型组相比,低/高剂量芍药苷组骨折线能达到完全愈合程度,骨小梁结构变紧密,骨质增厚,骨的连续性变好,血清中碱性磷酸酶、磷、钙水平、最大载荷、刚度、血管数量、血管面积及 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白表达均明显升高( $P < 0.05$ );联合干预组则逆转上述变化。结论:芍药苷可能通过激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路,促进血管形成及骨折部位钙盐沉积,进而促进骨折愈合。

**[关键词]** 芍药苷;缺氧诱导因子-1 $\alpha$ /血管内皮生长因子;骨折愈合;血管生成

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2025)03-0012-06

**DOI:** 10. 20085/j. cnki. issn1005-0205. 250303

## Mechanism of Paeoniflorin Promoting Angiogenesis and Fracture Healing in Fractured Rats

SHEN Runbin<sup>1</sup> ZHANG Qian<sup>1</sup> WANG Xuyang<sup>1</sup> LI Guoliang<sup>1</sup> MA Shiqiang<sup>1</sup>  
YUAN Cuicui<sup>1</sup> JIN Tao<sup>1</sup> HAN Guangpu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine in Hebei Province, Cangzhou 061000, Hebei China.

**Abstract Objective:** To investigate the effect of paeoniflorin on angiogenesis and fracture healing in rats with fractures by regulating hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway. **Methods:** A rat model of tibial fracture was constructed, and the rats with fracture were randomly separated into model group, low dose paeoniflorin group, high dose paeoniflorin group and joint intervention group. Among them, the low dose paeoniflorin group and the high dose paeoniflorin group were intraperitoneally injected with 5 and 20 mg/kg paeoniflorin, respectively, and the joint intervention group was intraperitoneally injected with 20 mg/kg paeoniflorin + 100 mg/kg PX-478 (HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway inhibitor) for 4 weeks, with 6 rats in each group. 6 healthy rats (only the right lower limb incision wound and suture without sawing off the tibia) were randomly selected as the sham group, and the sham group and the model group were injected with the same amount of normal saline. ELISA was used to detect the levels of alkaline phosphatase (ALP), calcium, phosphorus and other levels in serum, X-ray was used to detect the degree of healing of tibial fractures. Biomechanical experiments were conducted to detect the relevant indexes of rats, HE was used to detect angiogenesis at

the fracture site. Western Blot was used to detect HIF-1 $\alpha$  and VEGF proteins. **Results:** Compared with the sham group, the model group had obvious fracture lines in the tibia, more ma-

基金项目:河北省中医药管理局科研计划项目(2018491)

<sup>1</sup> 河北省沧州中西医结合医院(河北 沧州, 061000)

ture bone tissue, and the trabeculae were arranged in a network, the levels of ALP, phosphorus, calcium in serum, maximum load, stiffness, number of blood vessels, blood vessel area, and the protein expressions of HIF-1 $\alpha$  and VEGF were obviously reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the fracture line of the low dose paeoniflorin group and the high dose paeoniflorin group could reach the degree of complete healing, the beam structure became tighter, the bone thickened, and the continuity of the bone became better, the levels of ALP, phosphorus, calcium in serum, maximum load, stiffness, number of blood vessels, blood vessel area, and the protein expressions of HIF-1 $\alpha$  and VEGF were obviously increased ( $P < 0.05$ ). The joint intervention group reversed these changes. **Conclusion:** Paeoniflorin may promote angiogenesis and calcium salt deposition at the fracture site by activating the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway, thereby promoting fracture healing.

**Keywords:** paeoniflorin; hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ /vascular endothelial growth factor; fracture healing; angiogenesis

骨骼具有罕见的无疤痕再生能力,可以完全恢复受伤的骨骼状态。然而骨折和骨修复过程给患者和社会带来巨大的负担,大约 5%~10% 的患者骨折愈合延迟导致骨不连<sup>[1]</sup>。骨折愈合是一个复杂的过程,涉及许多不同过程的协调,血管形成在骨折愈合的早期阶段起着重要作用,骨折部位血管是能将氧气、营养物质和骨髓细胞输送到受伤部位的重要途径<sup>[2]</sup>。当潜在的病变导致骨折愈合组织无法完全骨化或完全不形成时,就会发生骨折不愈合。促进骨折愈合的相关研究未能解决部分骨折不愈合难题,与骨折愈合和血管生成相关研究及相关药物的开发研究很少,因此值得进一步深入研究。芍药苷具有抗炎、抗血栓形成、镇痛和免疫调节等作用<sup>[3]</sup>,研究表明芍药苷促进组织中血管生成,手术部位伤口愈合以及术后疼痛<sup>[4-5]</sup>。芍药及其活性成分芍药内酯苷可促进成骨分化和骨折愈合<sup>[6]</sup>,故推测芍药苷可能具有促进骨折愈合和血管生成的作用。缺氧诱导因子(HIF-1 $\alpha$ )是一种受缺氧调控的转录因子,骨折发生时降低血氧饱和度,在缺氧组织中 HIF-1 $\alpha$  被激活而上调血管内皮生长因子(VEGF)表达<sup>[7]</sup>。研究表明激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路,增加骨小梁面积、数量和厚度,可促进血管生成和成骨分化<sup>[8-9]</sup>。最近的一项动物实验研究表明, HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 在骨折大鼠骨髓组织中表达下调,提高其表达有助于促进血管生成和骨折愈合<sup>[10]</sup>。芍药苷通过激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路促进难愈性溃疡大鼠创面愈合<sup>[11]</sup>,基于此,本研究推测芍药苷可能通过 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路影响骨折愈合和血管生成。本研究以骨折大鼠为研究对象,探讨芍药苷对骨折大鼠血管生成和骨折愈合的影响及其作用机制,现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料来源

SD 大鼠购自青岛大任富城畜牧有限公司,许可证号为 SYXK(鲁)2024 0002。本研究经本院动物伦理委员会审批同意。

### 1.2 试剂与仪器

芍药苷(CAS 号为 23180-57-6, MercK 公司);PX-

478(HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路抑制剂, CAS 号为 685898-44-6, MCE 公司); HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、 $\beta$ -tubulin、山羊抗兔 IgG H&L、山羊抗鼠 IgG H&L(货号为 ab1、ab32152、ab7291、ab6702、ab6789, abcam 公司);大鼠碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒、钙含量检测试剂盒(货号为 P0321S 和 S1063S, 上海碧云天);磷含量检测试剂盒(货号为 ml003360, 武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);苏木精-伊红(HE)染色剂试剂盒(货号为 G1120, 索莱宝公司);光学显微镜(型号为 CKX53SF-R, Olympus 公司);X 射线机(型号为 DF-323H, 盛邦公司);ECL 化学发光试剂盒、酶标仪、化学发光成像仪(货号为 1705060, 型号为 iMark 和 ChemiDoc<sup>TM</sup>, 伯乐公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 造模、分组、给药** SD 大鼠适应性喂养 1 周,麻醉、造模台固定大鼠、术区剪毛、消毒。右下肢骨外侧纵向切开皮肤,分离软组织,线锯锯断胫骨,使其形成横向骨折。右侧髌旁做切口,用电钻打入  $\Phi 1.5$  mm 克氏针(位置由股骨内外两侧经髓腔)<sup>[12]</sup>,无菌生理盐水冲洗,缝合伤口。为防止感染,术后 3 d 腹腔注射青霉素,术后 1 d 观察下肢活动欠佳且 X 射线下胫骨不连续,认为模型构建成功。

将造模成功大鼠模型依据随机数字表法随机分为模型组、低剂量芍药苷组、高剂量芍药苷组、联合干预组。其中低剂量芍药苷组、高剂量芍药苷组分别腹腔注射 5, 20 mg/kg 芍药苷<sup>[13]</sup>,联合干预组在腹腔注射 20 mg/kg 芍药苷同时再注射 100 mg/kg 的 PX-478<sup>[11]</sup>,持续给药 4 周,每组各 6 只。同批鼠中随机选取 6 只健康大鼠作为假手术组(只右下肢切开伤口缝合,不锯断胫骨),假手术组和模型组注射等量的生理盐水。

### 1.3.2 比色法检测血清中的碱性磷酸酶、钙、磷水平

处死大鼠前抽取心脏血液,离心取上清,按照碱性磷酸酶、钙、磷试剂盒步骤处理上清,分别在 405, 575, 660 nm 处测量吸光度,并根据相应的标准曲线计算血清中碱性磷酸酶、钙、磷水平。

**1.3.3 X 射线检测胫骨骨折愈合程度** 将各组大鼠胫骨骨折处采用 X 射线检查,参考李义等<sup>[14]</sup>文献评估

愈合情况,骨折愈合情况分为不愈合、可能愈合、完全愈合 3 种程度。

**1.3.4 生物力学实验检测**各组大鼠生物力学指标拍片后处死大鼠,剥离胫骨骨折处组织用于后续 Western Blot 法检测,将胫骨置于生物力学试验机上,支点跨距为 17 mm,加载速度为 2 mm/min,记录载荷原位移曲线,计算最大载荷和刚度。

**1.3.5 HE 检测骨折部位血管生成情况** 收集各组大鼠胫骨固定、脱钙脱水、蜡块包埋、切片 4 μm(以骨折部位为中心纵向切片),按照 HE 染色步骤进行操作,在光镜下观察。

**1.3.6 Western Blot 法检测相关通路蛋白** 取胫骨骨折处组织,研磨、超声破碎、提蛋白,BCA 测定,调整蛋白浓度,蛋白变性,电泳,转印,封闭,PBS 漂洗。一抗 HIF-1α(1:1 000)、VEGF(1:2 000)、β-tubulin(1:5 000),4 ℃ 过夜孵育,PBS 漂洗,然后二抗抗体

(1:5 000)孵育 1 h,化学发光显影仪 ECL 发光显色。

1.4 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  形式表示,采用 SPSS 26.00 分析,多组比较用单因素方差分析,组间两两比较用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芍药苷对各组大鼠血清中碱性磷酸酶、钙、磷水平的影响

与假手术组相比,模型组血清中碱性磷酸酶、磷、钙水平均明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组相比,低剂量芍药苷组和高剂量芍药苷组血清中碱性磷酸酶、磷、钙水平均逐渐升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与高剂量芍药苷组相比,联合干预组血清中碱性磷酸酶、磷、钙水平均明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

2.2 芍药苷对各组大鼠骨折愈合程度的影响

表 1 各组大鼠血清中碱性磷酸酶、钙、磷水平变化( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	碱性磷酸酶/(U · L <sup>-1</sup> )	钙/(mmol · L <sup>-1</sup> )	磷/(mmol · L <sup>-1</sup> )
假手术组	158.22 ± 11.46	0.58 ± 0.04	1.57 ± 0.12
模型组	82.54 ± 7.16 <sup>1)</sup>	0.31 ± 0.02 <sup>1)</sup>	0.92 ± 0.08 <sup>1)</sup>
低剂量芍药苷组	113.89 ± 9.52 <sup>2)</sup>	0.42 ± 0.04 <sup>2)</sup>	1.16 ± 0.09 <sup>2)</sup>
高剂量芍药苷组	148.76 ± 12.47 <sup>2)3)</sup>	0.54 ± 0.05 <sup>2)3)</sup>	1.49 ± 0.12 <sup>2)3)</sup>
联合干预组	105.73 ± 9.44 <sup>4)</sup>	0.36 ± 0.03 <sup>4)</sup>	1.06 ± 0.09 <sup>4)</sup>

注:1)与假手术组比, $P < 0.05$ ;2)与模型组比, $P < 0.05$ ;3)与低剂量芍药苷组比, $P < 0.05$ ;4)与高剂量芍药苷组比, $P < 0.05$ 。

与假手术组比,模型组大鼠胫骨有明显的骨折线;与模型组比,低剂量芍药苷组和高剂量芍药苷组骨折

线能达到完全愈合程度;联合干预组和模型组骨折线程度相近,见图 1。

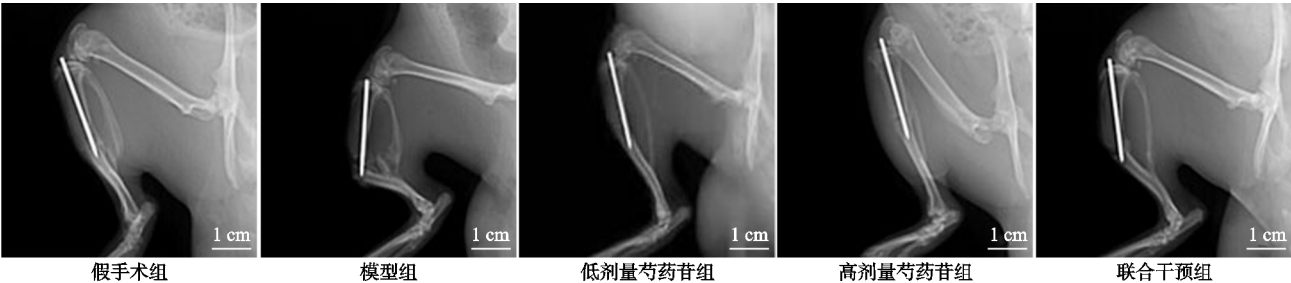


图 1 芍药苷对各组大鼠骨折愈合程度的影响

2.3 芍药苷对各组大鼠胫骨生物力学指标的影响

与假手术组比,模型组最大载荷、刚度均明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比,低剂量芍药苷组和高剂量芍药苷组最大载荷及刚度均逐渐升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与高剂量芍药苷组比,联合干预组最大载荷及刚度均明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

2.4 芍药苷对各组大鼠骨折部位血管生成的影响

假手术组中有较多成熟骨组织,骨小梁排列呈网状;模型组中有大量纤维组织,骨小梁稀疏且纤细,排列紊乱,间隙宽,骨质薄;与模型组比,低剂量芍药苷组和高剂量芍药苷组骨小梁结构变紧密,骨质增厚,骨的连续性较好;联合干预组与模型组程度相当,见图 2。

表 2 各组大鼠胫骨最大载荷及刚度的变化( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	最大载荷/N	刚度/(N · mm <sup>-1</sup> )
假手术组	28.48 ± 2.14	96.47 ± 7.68
模型组	15.86 ± 0.93 <sup>1)</sup>	63.47 ± 5.21 <sup>1)</sup>
低剂量芍药苷组	19.72 ± 1.14 <sup>2)</sup>	78.77 ± 6.08 <sup>2)</sup>
高剂量芍药苷组	26.54 ± 2.31 <sup>2)3)</sup>	94.35 ± 8.14 <sup>2)3)</sup>
联合干预组	18.69 ± 1.73 <sup>4)</sup>	67.89 ± 6.26 <sup>4)</sup>

注:1)与假手术组比, $P < 0.05$ ;2)与模型组比, $P < 0.05$ ;3)与低剂量芍药苷组比, $P < 0.05$ ;4)与高剂量芍药苷组比, $P < 0.05$ 。

与假手术组比,模型组血管数量和血管面积显著降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比,低剂量芍药苷组和高剂量芍药苷组血管数量及血管面积升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与高剂量芍药苷



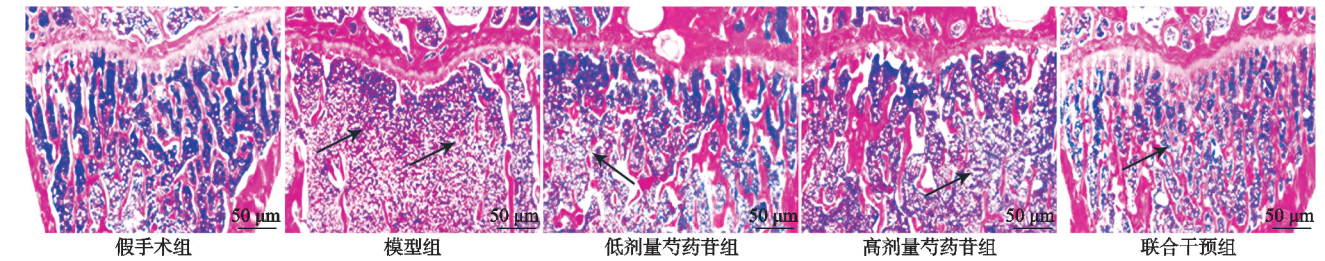


图 2 芍药苷对各组大鼠骨折部位血管生成的影响箭头指向骨小梁损伤部位(×200)

组比,联合干预组血管数量及血管面积显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 3。

表 3 各组大鼠骨折部位血管数量及血管面积变化( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	血管数量/个	血管面积/ $\text{mm}^2$
假手术组	$18.32 \pm 1.65$	$7\,246.37 \pm 638.45$
模型组	$7.28 \pm 0.74^{1)}$	$2\,057.61 \pm 154.75^{1)}$
低剂量芍药苷组	$11.66 \pm 1.08^{2)}$	$3\,574.85 \pm 315.72^{2)}$
高剂量芍药苷组	$16.78 \pm 1.44^{2)3)}$	$6\,476.49 \pm 578.39^{2)3)}$
联合干预组	$9.63 \pm 0.92^{1)}$	$2\,956.28 \pm 254.68^{1)}$

注:1)与假手术组比, $P<0.05$ ;2)与模型组比, $P<0.05$ ;3)与低剂量芍药苷组比, $P<0.05$ ;4)与高剂量芍药苷组比, $P<0.05$ 。

2.5 芍药苷对通路相关蛋白表达的影响

大鼠骨折处组织中 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 蛋白相对表达见表 4 及图 3。与假手术组比,模型组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白相对表达显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与模型组比,低剂量芍药苷组和高剂量芍药苷组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白相对表达升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与高剂量芍药苷组比,联合干预组 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF 蛋白相对表达显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 4 大鼠骨折处组织中 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 蛋白相对表达情况( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	HIF-1 $\alpha$ /GAPDH	VEGF/GAPDH
假手术组	$2.36 \pm 0.21$	$1.98 \pm 0.17$
模型组	$0.82 \pm 0.07^{1)}$	$0.69 \pm 0.06^{1)}$
低剂量芍药苷组	$1.11 \pm 0.08^{2)}$	$0.96 \pm 0.07^{2)}$
高剂量芍药苷组	$2.07 \pm 0.19^{2)3)}$	$1.79 \pm 0.16^{2)3)}$
联合干预组	$1.68 \pm 0.15^{1)}$	$1.44 \pm 0.13^{4)}$

注:1)与假手术组比, $P<0.05$ ;2)与模型组比, $P<0.05$ ;3)与低剂量芍药苷组比, $P<0.05$ ;4)与高剂量芍药苷组比, $P<0.05$ 。

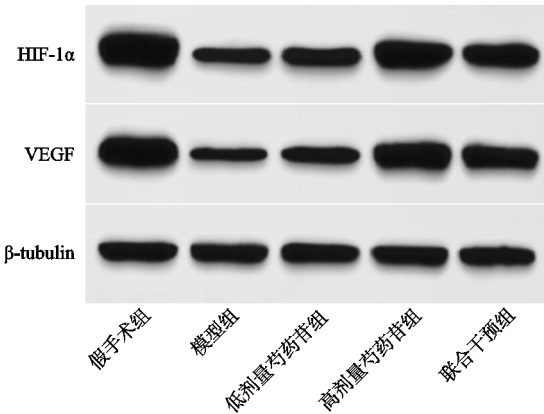


图 3 大鼠骨折处组织中 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 蛋白表达情况

3 讨论

骨折和骨相关疾病的发生率每年都在增加,骨折愈合和骨修复是一个复杂的病理过程<sup>[15]</sup>。骨相关疾病患者在骨折治疗后会因某种原因而延迟愈合,例如血管形成较少导致血液供应不足。其中氧饱和度、pH、细胞因子和生长因子,都可能直接影响血管形成、骨细胞的增殖和分化以及矿物质的沉淀,从而影响骨折愈合<sup>[16]</sup>。目前促进骨折愈合有电刺激、补锌、左旋多巴、自体骨髓移植、骨形态形成蛋白刺激成骨、骨和骨膜移植等方法,作为辅助治疗方法有一定的治疗作用,但又不尽如人意,需要寻找新的治疗药物,为临床治疗提供新的方法。

中草药及其活性成分具有促进血管生成的作用,最常研究的是三七的三七总皂苷、黄芪的黄芪苷以及芍药的芍药苷<sup>[17]</sup>。芍药作为中药被用于治疗疼痛、炎症和免疫紊乱已有一千多年历史,芍药苷是从芍药中提取的有效活性成分,具有抗炎、抗血栓形成、镇痛和免疫调节等作用<sup>[3]</sup>。Li 等<sup>[18]</sup>研究发现,芍药苷在促进脑缺血后血管生成方面具有潜在的保护作用。Liu 等<sup>[19]</sup>研究发现,芍药苷能缓解骨质流失,减轻骨质疏松症。Andoh 等<sup>[5]</sup>研究发现,芍药苷治疗可加速手术部位伤口愈合,促进成纤维细胞增殖,并减少术后疼痛。近期一项网络药理学分析结果显示,芍药苷是桃红四物汤促进骨折愈合的核心成分之一<sup>[20]</sup>,但芍药苷在骨折愈合和血管生成的作用尚未得到实验证实,因此值得深入研究。本研究首次发现,芍药苷处理后骨折大鼠骨小梁结构变紧密,骨质增厚,骨的连续性变好,骨折线能达到完全愈合程度,最大载荷、刚度、血管数量、血管面积增高,说明芍药苷能改善骨生物力学性能及血管生成,对骨伤口愈合具有治疗作用。本研究还发现,芍药苷治疗后血清碱性磷酸酶、磷、钙水平增加,这可能是一些代谢途径被动员或激活来驱动骨重建。钙和磷是重要的骨矿物质,研究显示骨折大鼠血清中钙和磷的水平下降<sup>[21-22]</sup>,这与本文造模大鼠血清中钙磷水平的趋势一致,而芍药苷处理后血清钙和磷含量的增加可能是由于这些元素从食物中吸收的增加或从体内排泄的减少。碱性磷酸酶在硬组织的形成中起着至关重要的作用,并且在矿化组织中经常被上调,

以增加骨中有机磷酸盐的定位和矿化,碱性磷酸酶的升高可能是由于骨中成骨细胞活性的增加导致的<sup>[23-24]</sup>。以上研究表明芍药苷对于血管形成和骨折愈合有良好作用。

骨折通常伴有血管破裂和栓塞,引起局部和全身血流流速减慢,增加血液粘度,减慢局部微循环血流,降低组织血氧饱和度,缺氧可能会引发 VEGF、促红细胞生成素、酪氨酸羟化酶转录和翻译。研究表明,在缺氧条件下, HIF-1 $\alpha$  作为血管生成的中枢调节因子表达上调,并能通过改变相关生长因子的表达直接参与血管生成的整个过程<sup>[25-26]</sup>。HIF-1 $\alpha$  的表达在预防骨代谢疾病中起着至关重要的作用, HIF-1 $\alpha$  在骨骼系统中的生物学功能,特别是在骨髓间充质干细胞(BMSC)和骨髓来源的巨噬细胞(BMM)中的生物学功能已被广泛研究<sup>[27]</sup>。HIF-1 $\alpha$  及其靶基因在多种生物过程中发挥作用,包括细胞存活、血管生成、骨祖细胞募集和骨形成诱导, HIF-1 $\alpha$  可诱导骨形成、促进体内 VEGF 表达进而诱导血管生成<sup>[28]</sup>。也有研究表明,增加 HIF-1 $\alpha$  表达可改善血管生成和成骨分化,从而促进骨髓间充质干细胞的成骨<sup>[29]</sup>。以上研究表明 HIF-1 $\alpha$  在平衡骨稳态和促进成骨分化方面起着重要作用。上调 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 表达以激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路可促进血管生成和骨生成,加速骨折愈合<sup>[9,30]</sup>。Tang 等<sup>[8]</sup>研究表明,促进 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 的表达,增加骨折大鼠的骨小梁面积、数量和厚度,施加 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路抑制剂,则逆转这些变化,表明促进 HIF-1 $\alpha$  信号通路促进血管生成和成骨,同时可以降低炎症风险,改善血液循环。本研究表明,芍药苷处理后骨折大鼠 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 蛋白表达升高,提示 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路激活介导芍药苷促进骨折愈合这一过程。为明确芍药苷与 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 的调节关系,本研究利用芍药苷和 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 抑制剂 PX-478 共同干预骨折大鼠,结果发现 PX-478 不仅逆转了芍药苷对 HIF-1 $\alpha$  及 VEGF 蛋白表达的促进作用,还恢复了芍药苷对血管生成和骨折愈合的改善作用,表明芍药苷可能通过激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路,促进血管形成,促进骨折部位钙盐沉积进而骨折愈合。

虽然本研究证实芍药苷在促进骨折愈合方面是有效的,但也有一定的局限性:使用的芍药苷剂量范围不足以优化治疗效果,未在多个时间点进行生物力学性能和蛋白质合成的测量,机制研究只局限于 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 这一通路,可能还有别的通路参与。此外,还需要大规模的动物和人体研究来验证在大鼠试验中观察到的结果。

综上所述,芍药苷可能通过激活 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 通路,促进血管形成及骨折部位钙盐沉积,进而促进骨

折愈合。本研究结果可为骨折治疗提供新的治疗策略。

## 参考文献

- [1] HOFMAN M, ANDRUSZKOW H, HEYER F L, et al. Risk factors of non-union in intramedullary stabilized diaphyseal long bone fractures; identifying the role of fracture stabilization strategies and concomitant injuries[J]. Eur J Trauma Emerg Surg, 2021, 47(6):1903-1910.
- [2] KAN T, HE Z, DU J, et al. Irisin promotes fracture healing by improving osteogenesis and angiogenesis[J]. J Orthop Translat, 2022, 37(1):37-45.
- [3] ZHOU Y X, GONG X H, ZHANG H, et al. A review on the pharmacokinetics of paeoniflorin and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 130(1):105-113.
- [4] JIANG J, DONG C, ZHAI L, et al. Paeoniflorin suppresses TBHP-induced oxidative stress and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via the Nrf2/HO-1 signaling pathway and improves skin flap survival[J]. Front Pharmacol, 2021, 12(1):756-764.
- [5] ANDOH T, GOTO M. Repeated topical paeoniflorin attenuates postoperative pain and accelerates cutaneous fibroblast proliferation in mice[J]. J Pharmacol Sci, 2023, 151(2):84-87.
- [6] KIM J H, KIM M, HONG S, et al. Albiflorin promotes osteoblast differentiation and healing of rat femoral fractures through enhancing BMP-2/Smad and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:690113.
- [7] BAI J, LI L, KOU N, et al. Low level laser therapy promotes bone regeneration by coupling angiogenesis and osteogenesis[J]. Stem Cell Res Ther, 2021, 12(1):78-85.
- [8] SONG S, ZHANG G, CHEN X, et al. HIF-1 $\alpha$  increases the osteogenic capacity of ADSCs by coupling angiogenesis and osteogenesis via the HIF-1 $\alpha$ /VEGF/AKT/mTOR signaling pathway[J]. J Nanobiotechnology, 2023, 21(1):257-266.
- [9] TANG Z, YIN M, GUO Y, et al. Taohong Siwu decoction promotes osteo-angiogenesis in fractures by regulating the HIF-1 $\alpha$  signaling pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022(1):453-461.
- [10] 孟繁杰, 马青嵩, 陈曼丽, 等. 瑞香素调节缺氧诱导因子-1 $\alpha$ /血管内皮生长因子信号通路对胫骨骨折大鼠骨痂形成和血管生成的影响实验研究[J]. 陕西医学杂志, 2024, 53(9):1182-1186.
- [11] 吴熙, 陈高. 芍药苷对难愈性溃疡大鼠创面愈合及 HIF-1 $\alpha$ /VEGF/VEGFR2 信号通路的影响[J]. 河北医学, 2023, 29(3):369-374.
- [12] 廉檬檬, 聂云飞, 李放, 等. 微小 RNA-126 对大鼠骨痂组织血管生成的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2022, 39(4):697-700.

- [13] 王亚娜,许晓琳,马文华,等. 芍药苷调节 PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B 信号通路对血栓闭塞性脉管炎大鼠的治疗作用研究[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(6):854-858.
- [14] 李义,杨彦君,彭松云,等. 苗药九仙罗汉接骨汤干预胫骨骨折模型大鼠的成骨分化及骨折愈合[J]. 中国组织工程研究,2022,26(33):5350-5356.
- [15] SAUL D, KHOSLA S. Fracture healing in the setting of endocrine diseases, aging, and cellular senescence[J]. Endocr Rev, 2022, 43(6):984-1002.
- [16] WALTERS G, POUNTOS I, GIANNODIS P V. The cytokines and micro-environment of fracture haematoma: current evidence[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2018, 12(3):1662-1677.
- [17] LI J J, LI R K, WU X P, et al. An update on the potential application of herbal medicine in promoting angiogenesis[J]. Front Pharmacol, 2022, 13:928817.
- [18] LI H, YU W, YANG Y, et al. Combination of atractylenolide I, atractylenolide III, and paeoniflorin promotes angiogenesis and improves neurological recovery in a mouse model of ischemic stroke[J]. Chin Med, 2024, 19(1):32-36.
- [19] LIU H, CHANG Z, LIU S, et al. MEDAG expression in vitro and paeoniflorin alleviates bone loss by regulating the MEDAG/AMPK/PPAR $\gamma$  signaling pathway in vivo[J]. Heliyon, 2024, 10(1):e24241.
- [20] 杜克群, 江华娟, 李敏敏, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap/MS 和网络药理学的桃红四物汤促进骨折愈合潜在药效物质及作用机制研究[J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(6):633-643.
- [21] 王一飞, 薛锋. 黄精多糖对胫骨骨折大鼠骨折愈合的作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(17):3803-3807.
- [22] LIAO F, ZHU Z, XIAO C, et al. Hydrogen sulfide inhibits calcium and phosphorus loss after fracture by negatively regulating glucocorticoid/glucocorticoid receptor  $\alpha$  [J]. Life Sci, 2021, 274:119363.
- [23] HU X, GU Y, WU Q, et al. Celastrol enhances bone wound healing in rats[J]. Acta Biochim Pol, 2022, 69(4):839-845.
- [24] 王慧, 潘茂圣. 血根碱通过激活分泌型糖蛋白/ $\beta$ -链蛋白信号通路促进脊柱骨折大鼠骨折愈合的实验研究[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2023, 31(8):13-18.
- [25] PFEIFFENBERGER M, BARTSCH J, HOFF P, et al. Hypoxia and mesenchymal stromal cells as key drivers of initial fracture healing in an equine in vitro fracture hematoma model[J]. PLoS One, 2019, 14(4):1548-1557.
- [26] LI F, TAN Q, LI F, et al. Hypoxia-induced Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activation in subchondral bone osteoblasts leads to an osteoarthritis-like phenotype of chondrocytes in articular cartilage[J]. Front Mol Biosci, 2023, 10(1):1057-1065.
- [27] CHEN W, WU P, YU F, et al. HIF-1 $\alpha$  regulates bone homeostasis and angiogenesis, participating in the occurrence of bone metabolic diseases[J]. Cells, 2022, 11(22):3552-3561.
- [28] ZHANG X, HOU L, LI F, et al. Piezo1-mediated mechanosensation in bone marrow macrophages promotes vascular niche regeneration after irradiation injury[J]. Theranostics, 2022, 12(4):1621-1638.
- [29] DUFRANE D. Impact of age on human adipose stem cells for bone tissue engineering[J]. Cell Transplant, 2017, 26(9):1496-1504.
- [30] CHEN X, HE S, DONG Y, et al. Cobalt-doped layered hydroxide coating on titanium implants promotes vascularization and osteogenesis for accelerated fracture healing[J]. Mater Today Bio, 2023, 24:100912.

(收稿日期:2024-06-09)

(上接第 11 页)

- [16] 李鹏洋,李春根,叶超,等. 中药柚皮苷结合兔骨髓间充质干细胞治疗兔膝关节软骨缺损实验研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(8):34-38.
- [17] 李建业,董金波,王继祥,等. miR-218-5p 与 SOST 在 OA 患者软骨下骨中的表达[J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(19):4743-4745.
- [18] BELLIDO M, LUGO L, ROMANBLAS J A, et al. Improving subchondral bone integrity reduces progression of cartilage damage in experimental osteoarthritis preceded by osteoporosis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2011, 19(10):1228-1236.
- [19] CHAWLA S, MAINARDI A, MAJUMDER N, et al. Chondrocyte hypertrophy in osteoarthritis: mechanistic studies and models for the identification of new therapeutic strategies[J]. Cells, 2022, 11(24):4034.
- [20] XU X, ZHENG L, YUAN Q, et al. Transforming growth factor- $\beta$  in stem cells and tissue homeostasis[J]. Bone Research, 2018, 6(1):1-31.

(收稿日期:2024-10-05)